



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**La melatonina inhibe la respuesta colinérgica
aférente de los nervios mesentéricos del yeyuno**

Tesis que presenta

Daniel Alberto Torres García

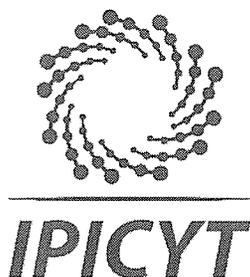
Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias en Biología Molecular

Codirectores del trabajo de tesis:

**Dr. Carlos Barajas López
Dra. Marcela Miranda Morales**

San Luis Potosí, S.L.P., Julio 2019



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "*La melatonina inhibe la respuesta colinérgica aferente de los nervios mesentéricos del yeyuno*" presentada para obtener el Grado de Maestro en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Daniel Alberto Torres García** y aprobada el ocho de julio del dos mil diecinueve por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Carlos Barajas López
Codirector de la tesis

Dra. Marcela Miranda Morales
Codirectora de la tesis

Dr. Antonio De León Rodríguez
Miembro del Comité Tutorial

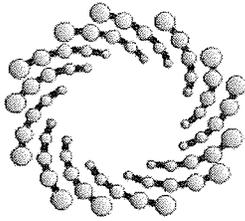
Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont
Miembro del Comité Tutorial



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Neurobiología de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Carlos Barajas López y la Dra. Marcela Miranda Morales

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología Registro: 636053 y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.
Fondos sectoriales SEP-5-3197



IPICYT

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 193 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 8 días del mes de julio del año 2019, se reunió a las 16:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Antonio De León Rodríguez	Presidente	IPICYT
Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont	Secretario	IPICYT
Dr. Rubén Hipólito López Revilla	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó el C.

Daniel Alberto Torres García

sobre la Tesis intitulada:

La melatonina inhibe la respuesta colinérgica aferente de los nervios mesentéricos del yeyuno

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Carlos Barajas López
Dra. Marcela Miranda Morales (UASLP)

El Jurado, después de deliberar, determinó

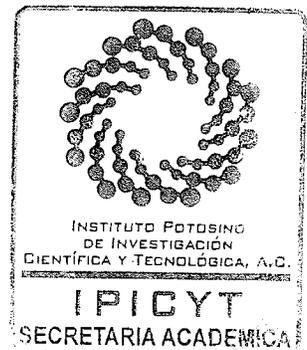
APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 17:45 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 8 días del mes de julio de 2019.

Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado



Dedicatorias

Quiero dedicar este trabajo a mi familia, a mis tías, por apoyarme y ayudarme incondicional desde que decidí iniciar este camino.

A mi abuela porque siempre ha creído en mí sobre todo cuando he dudado de mí mismo.

Las quiero mucho

Agradecimientos

Quiero agradecer principalmente al Dr. Carlos Barajas López[†] por aceptarme en su laboratorio y por todas las cosas que me enseñó, académicamente y también por sus buenos consejos

Quiero agradecer a la Dra. Marcela Miranda Morales por su apoyo en este proyecto. Por su paciencia, por sus enseñanzas y por su ayuda.

A mi comité tutorial, al Dr. Antonio De León Rodríguez y al Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont, por sus correcciones y aportaciones a este trabajo

A la Enf. Rosa Espinosa Luna, muchas gracias por estar ahí siempre apoyándome aun en los momentos de adversidad, gracias por su paciencia y cariño.

A mis amigos del laboratorio de Neurobiología a Jess, Karen, Fany, Nikté, Manuel, Denisse, Annie, y Mariela gracias por todo lo que me enseñaron, por todos los momentos divertidos que tuvimos y las cosas que vivimos juntos.

A Rosy Cruz, por su ayuda indispensable en el bioterio cuidando a los ratoncitos, y estar al pendiente del laboratorio.

Al CONACYT por becarme, y al IPICYT por aceptarme y darme la oportunidad de iniciar mi formación como investigador.

A mis amigos Ricardo y Daniel, porque creo que sin ustedes no hubiera sobrevivido el primer semestre, fueron como mi familia en esos momentos

complicados y a Sara gracias por escucharme, por los consejos y ser mi amiga y compañera de casa.

A mis amigos Iván y Miguel, porque a distancia siempre me apoyaron y me dieron ánimos para que no me rindiera.

A mis amigos del laboratorio 4, Víctor, Karen, Cecy, Marco por tanta diversión y por ayudarme en la última etapa de la maestría.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos Institucionales	iii
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Contenido	viii
Resumen	xi
Abstract	xii
INTRODUCCIÓN	1
Sistema Nervioso Entérico	1
Receptores Colinérgicos	2
Papel fisiológico y funciones de la Melatonina en el intestino	4
OBJETIVOS	6
METODOLOGÍA	7
Animales	7
Preparación del tejido	7
Registro multiunitario del nervio mesentérico	8
Análisis de los datos	8
RESULTADOS	9
La acetilcolina aumenta la actividad multiunitaria de los nervios mesentéricos del intestino delgado de ratón	9
La respuesta colinérgica de los nervios mesentéricos esta mediada por receptores nicotínicos y muscarínicos	9
La melatonina inhibe la actividad inducida por ACh en los nervios mesentéricos	10
La melatonina no tiene efecto sobre la actividad aferente del nervio mesentérico	11

La melatonina inhibe la actividad inducida por nicotina en los nervios mesentéricos	11
DISCUSIÓN	12
CONCLUSIONES	16
Lista de Figuras	17
Bibliografía	22

LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1. La acetilcolina aumenta la frecuencia de la multiunitaria de los nervios aferentes del intestino delgado del yeyuno de ratón de manera concentración dependiente. 17
- Fig. 2. Proporción de receptores nicotínicos y muscarínicos que median la respuesta colinérgica en los nervios mesentéricos de yeyuno de ratón..... 18
- Fig. 3. La melatonina inhibe la respuesta inducida por acetilcolina..... 19
- Fig. 4. La melatonina no tiene efecto sobre la actividad aferente del nervio mesentérico 20

Resumen

La melatonina inhibe la respuesta colinérgica aferente de los nervios mesentéricos del yeyuno

CONTEXTO. La acetilcolina (ACh) es el principal neurotransmisor excitatorio del sistema nervioso entérico, regula el estado de las mucosas, las funciones motoras y sensoriales. Debido a la importancia de la ACh en las funciones del intestino, la búsqueda de moduladores es importante. Hay evidencia que la melatonina, una hormona que se encuentra en el intestino, puede inhibir la activación colinérgica. Por lo que en este trabajo se busca caracterizar farmacológicamente la respuesta colinérgica de la actividad aferente de los nervios mesentéricos del yeyuno de ratón e investigar el efecto de la melatonina sobre dicha respuesta

MÉTODOS. En cada registro de medición de la actividad multiunitaria de los nervios aferentes del yeyuno de ratón, se disecó un nervio, y se introdujo dentro de una micropipeta de cristal para su registró de la actividad multiunitaria basal y durante la aplicación de sustancias experimentales.

RESULTADOS. La acetilcolina aumentó la actividad multiunitaria de los nervios mesentéricos, mediante la activación de receptores nicotínicos y muscarínicos. La melatonina inhibió la activación colinérgica mediante inhibición de receptores nicotínicos.

CONCLUSIONES. La acetilcolina incrementa la actividad de los nervios mesentéricos del yeyuno dependiente de la concentración, este efecto es mediado principalmente por receptores nicotínicos. La melatonina inhibió parcialmente la actividad nicotínica de los nervios.

Palabras claves: Melatonina, multi-unitario, inhibición

Abstract

Melatonin inhibits the afferent cholinergic response of the jejunum mesenteric nerves

BACKGROUND. Acetylcholine (ACh) is the main excitatory neurotransmitter of the enteric nervous system, regulates motility, mucosal and sensory function. Due to the importance of ACh in enteric functions, searching modulators is important. There is evidence that melatonin a hormone located in the bowel inhibits cholinergic activation. Consequently, the purpose of this work is the pharmacologic characterization of the cholinergic activity in the afferent transmission of the mesenteric nerves of mice jejunum and elucidate the effect of melatonin on such activity.

METHODS. For each recording a mesenteric afferent nerve was dissected and secured to a glass micropipette by suction, once the spontaneous multiunit nerve spiking activity was obtained, the tissue was stabilized for 1 h before starting the experimental phase. All the drugs were applied by extraluminal perfusion with most wash intervals of 15 min.

RESULTS. Acetylcholine increased the multiunit nerve activity through activation of nicotinic and muscarinic receptors. Melatonin inhibited cholinergic activation by blocking nicotinic receptors.

CONCLUSIONS. Acetylcholine increases the mesenteric nerves activity concentration-dependent; this effect is mediated primarily by nicotinic receptors. Melatonin partially inhibits the nicotinic activation of the nerves.

Key word: Melatonin, multi-unit recording, inhibition

INTRODUCCIÓN

Sistema Nervioso Entérico

La función gastrointestinal está modulada y controlada por elementos intrínsecos y extrínsecos del sistema nervioso autónomo. Los elementos intrínsecos se localizan en el sistema nervioso entérico (SNE), plexos ganglionares entre capas musculares y la submucosa; y los elementos extrínsecos son las vías simpáticas y parasimpáticas que conectan al SNC con la pared intestinal y modulan reflejos entéricos (Blackshaw et al., 2007). El SNE está conformado por el plexo mientérico y el submucoso, de acuerdo a sus propiedades electrofisiológicas hay 2 tipos de neuronas, las neuronas “S” y las “AH”. (Galligan et al., 2000). En las neuronas S un solo estímulo eléctrico induce potenciales postsinápticos excitatorios rápidos, adicionalmente en las neuronas S la tetrodotoxina bloquea completamente los potenciales de acción del soma, las neuronas S son interneuronas y motoneuronas (Bornstein and Furness, 1994)(Costa et al., 1996). Las neuronas AH fueron denominadas así porque presentan una hiperpolarización posterior a la generación de un potencial de acción. El potencial de acción de las neuronas AH esta mediado en parte por corrientes de calcio consecuentemente, solo puede ser parcialmente bloqueado por la tetrodotoxina, los potenciales postsinapticos excitatorios rápidos registrados en neuronas AH están mediados por ACh y glutamato (Galligan et al., 2000), evidencia funcional y neuroanatómica indica que las neuronas AH son neuronas sensoriales (Furness et al., 1998).

El SNE posee la habilidad de modular actividades reflejas de manera casi independiente al SNC. Las actividades regulatorias del SNE se realizan mediante la existencia de diversos tipos de neuronas en el tracto gastrointestinal, estas neuronas expresan diversos neurotransmisores y receptores, que permiten un control preciso de la regulación de las funciones intestinales. Por ejemplo las neuronas mientéricas expresan receptores activados por neurotransmisores de naturaleza tanto peptídica como no peptídica. Sin embargo se sabe poco acerca de la relación entre el papel funcional de las neuronas entéricas con la expresión de receptores (Tack, 2000).

Receptores Colinérgicos

La acetilcolina (ACh) fue el primer neurotransmisor caracterizado en el SNC de los mamíferos, regula diversas funciones como el paso de sueño a vigilia y procesos de consolidación de la memoria y de componentes emocionales, además juegan un papel primordial en el control de la actividad motora. La acetilcolina se sintetiza a partir de la colina y acetil CoA, en una reacción catalizada por la colina acetiltransferasa (Albuquerque et al., 2018).

Se han identificado dos tipos de receptores colinérgicos: nicotínicos (nAChR) de tipo ionotrópico y muscarínicos (mAChR) de tipo metabotrópico (Flores and Segura, 2005).

⊕ **Receptores Muscarínicos**

Los receptores muscarínicos (mAChR) conforman una familia de receptores acoplados a proteína G, consisten en 5 diferentes subtipos denominados M₁ a M₅. Tres de estos receptores (M₁, M₃ y M₅) se acoplan a proteínas de la familia G_{q/11}, mientras los 2 subtipos restantes se acoplan a proteínas de la familia G_{i/o} (Kruse et al., 2014).

Los mAChR en el SNC regulan funciones centrales importantes incluyendo, procesos cognitivos, de comportamiento, sensorial y motor. En el SNP modulan procesos como la disminución del ritmo cardiaco y el incremento de la contractibilidad del musculo liso y secreción glandular (Wess et al., 2007).

⊕ **Receptores Nicotínicos**

Los receptores nicotínicos (nAChR) de mamíferos son pentámeros que resultan de la combinación de subunidades que forman los componentes principales de la estructura del sitio de unión al ligando (α 2, α 3, α 4, α 6, α 7, α 9, y α 10) y 4 subunidades estructurales (β 3, β 4 y β 5) que brindan propiedades funcionales y farmacológicas únicas a los receptores.

Existen 3 subgrupos principales, los receptores de alta afinidad a la nicotina nAChR α 4, con proteínas de unión a α -bungarotoxina nAChR α 7 y los receptores del sistema nervioso autónomo compuesto de nAChR α 3/ β 4 (Gahring and Rogers, 2006).

La diversidad de subunidades interactúan para producir un espectro de nAChRs que son expresados por diversos tipos celulares desde neuronas en el SNC y SNP hasta células no neuronales que conforman músculo, piel, páncreas, pulmón (Albuquerque et al., 2018) queratinocitos, células cancerosas, células inmunológicas, células epiteliales de las vías aéreas, células endoteliales vasculares y órganos reproductivos, entre otras (Kawashima and Fujii, 2008).

Papel fisiológico y funciones de la Melatonina en el intestino

La N-acetil-5-metoxitriptamina o melatonina es una hormona presente en humanos, animales, plantas y microorganismos. Está relacionada en diversos procesos regulatorios, como ritmos biológicos, reflejos intestinales, protección contra la inflamación, metabolismo y reproducción (Chen et al., 2011). Anteriormente se consideraba a la glándula pineal como la única fuente de síntesis de melatonina (Brzezinski, 1997). Sin embargo, tras la detección de las enzimas que sintetizan la melatonina en el intestino se consideró la posibilidad de fuentes extrapineales de síntesis de melatonina (Stefulj et al., 2001). La melatonina se produce en el intestino a través de las células enterocromafines (Thor et al., 2007), y también puede ser sintetizada por una variedad de células extrapineales, como células de la médula ósea (Conti et al., 2000), linfocitos, y mastocitos (Maldonado et al., 2010).

En contraste con el sistema nervioso central, la función de la melatonina en el intestino no es clara, existe evidencia que la melatonina juega un papel significativo en la regulación de la motilidad intestinal (Drago et al., 2002) y secreción (Chan et al., 1998), y de proveer protección en diferentes condiciones

patofisiológicas como síndrome de intestino irritable (Tien et al., 2014), cáncer (Li et al., 2017), úlceras gástricas (Bandyopadhyay et al., 2002) , entre otras. Otro efecto de la melatonina es la modulación de la flora intestinal (Paulose and Cassone, 2016) y potencial efecto antimicrobiano (Schultz et al., 2006).

Otro efecto de la melatonina es la modulación negativa de la excitabilidad neuronal, inhibe la contracción de musculo liso de íleon en ratas (Reyes-Vázquez et al., 1997), reduce la excitabilidad de neuronas de ganglio de la raíz dorsal (Oliveira-Abreu et al., 2018) y bloquea corrientes nicotínicas en neuronas submucosas (Barajas-López et al., 1996)

La ACh es el principal neurotransmisor excitatorio del SNE, y la transmisión colinérgica modula diversos fenómenos biológicos como motilidad, secreción, y transmisión sensorial.

Dada la evidencia de que la melatonina es un modulador negativo de la excitabilidad, el objetivo de este trabajo es caracterizar el efecto farmacológico de la ACh en la actividad aferente de los nervios del intestino de ratón y el efecto de la melatonina sobre la respuesta colinérgica.

OBJETIVOS

General

Caracterizar farmacológicamente la actividad aferente de los nervios mesentéricos del yeyuno de ratón.

Específicos

- Caracterizar farmacológicamente la respuesta colinérgica de la actividad aferente de los nervios mesentéricos del yeyuno de ratón
- Evaluar el potencial inhibitorio de diferentes concentraciones de melatonina sobre la respuesta colinérgica aferente.

METODOLOGÍA

Animales

Durante el desarrollo de este proyecto se utilizaron 40 ratones C57BL/6 de ambos sexos que fueron obtenidos del Instituto de Neurobiología, Campus Juriquilla, UNAM. Los animales tuvieron acceso a alimentos y agua *ad libitum*. Todos los experimentos fueron realizados en acuerdo con el Comité de Ética del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica.

Preparación del tejido

Los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical, después se realizó una incisión en el abdomen, se extrajo el intestino manteniendo el tejido mesentérico intacto, se colocó en solución de Krebs modificada cuya composición es la siguiente (en mM): NaCl 118.4, NaHCO₃ 24.9, CaCl₂ 1.9, MgSO₄ 7H₂O 1.2, KH₂PO₄ 1.2, KCl 2.3, D-glucosa 11.7, que fue gasificada continuamente con 95% O₂ y 5% CO₂. Se removió un segmento de aproximadamente 4 cm de yeyuno, se lavó internamente con una jeringa que contenía solución de Krebs modificada y se colocó en la cámara de registro que cuenta con perfusión extraluminal continua por gravedad de solución de Krebs modificada a una velocidad de 7 mL/min y una temperatura controlada de 33 a 34°C. El segmento de yeyuno también fue perfundido intraluminalmente a un flujo de 150 µL/min utilizando una bomba peristáltica con solución de Krebs modificada manteniendo los extremos del segmento atados a los tubos de la cámara de registro con hilo de seda. Posteriormente se realizó la microdissección de un nervio mesentérico, se cortó el

extremo distal del nervio y mediante succión se introdujo el nervio a una micropipeta de cristal obteniendo un sello con el tejido perineural y adiposo, finalmente se obtiene el registro extracelular de los potenciales de acción (actividad multiunitaria aferente) del nervio disecado.

Registro multiunitario del nervio mesentérico

La micropipeta se acopló a un cabezal (NL. 100, Digitimer Ltd) se amplificaron y filtraron las señales eléctricas mediante un amplificador NL104 y un filtro NL125 (Digitimer Ltd). La actividad eléctrica fue registrada en una computadora utilizando el software Spike2 (Cambridge Electronic Design). Una vez que se obtuvo actividad espontánea del nervio, el tejido se dejó estabilizar por 1 hora antes de empezar la fase experimental. Todos los fármacos fueron aplicados al menos por duplicado en la perfusión extraluminal a diversos tiempos con intervalos de lavado de 15 minutos.

Análisis de los datos

La actividad multiunitaria aferente fue cuantificada como los eventos con amplitud mayor que el doble del ruido basal. La respuesta a fármacos fue medida por el cambio de la media de la actividad en un periodo de 100 s (en el pico) menos la frecuencia basal medida durante 100 s.

Los fármacos fueron comprados en Sigma-Aldrich. El stock de soluciones de melatonina 1 M y atropina 100 mM fue preparado en DMSO como solvente, mientras que la acetilcolina 1 M, hexametonio 1M y nicotina 1M en agua destilada.

RESULTADOS

La acetilcolina aumenta la actividad multiunitaria de los nervios mesentéricos del intestino delgado de ratón

Se caracterizó el efecto de la acetilcolina sobre la actividad aferente del intestino. Se midió la actividad multiunitaria y se evaluó la respuesta colinérgica y su dependencia con la concentración, realizando aplicaciones extraluminales sucesivas de ACh (10-10000 μ M). Cada aplicación se llevó a cabo por 3 min iniciando con las concentraciones bajas, el tiempo de lavado entre dos aplicaciones sucesivas fue de 15 min con solución de Krebs modificada; con este protocolo obtuvimos un incremento de la actividad multiunitaria inducido por ACh, de manera dependiente de la concentración ($EC_{50} = 298.2 \mu$ M). Posteriormente decidimos caracterizar la participación de los dos receptores colinérgicos (nicotínicos y muscarínicos) que están involucrados en la actividad obtenida (Fig. 1).

La respuesta colinérgica de los nervios mesentéricos esta mediada por receptores nicotínicos y muscarínicos

Se investigó la proporción y tipo de receptores colinérgicos que participan en la respuesta de los nervios mesentéricos aferentes. Se realizaron aplicaciones sucesivas de ACh 1 mM (concentración submáxima) hasta obtener 3 respuestas estables (respuesta control inicial), posteriormente se pre-aplicó hexametonio (antagonista selectivo de los receptores nicotínicos, 1mM) durante 5 min, después

se co-aplicó hexametonio 1 mM y ACh 1 mM, finalmente se realizó un lavado de 15 min con solución de Krebs modificada y se aplicó ACh 1 mM (respuesta control final). El hexametonio inhibió en promedio el 63.85% SEM= 8.582 de la actividad inducida por ACh, (n= 3-5) la actividad multiunitaria remanente esta mediada por receptores muscarínicos, estos resultados fueron comprobados mediante la pre-aplicación de hexametonio 1 mM durante 5 min para bloquear la actividad nicotínica y posteriormente se co-aplicó hexametonio 1 mM más atropina 1 μ M (inhibidor no selectivo de los receptores muscarínicos) durante 3 min y se observó una inhibición del 90.92%, SEM= 9.226 (n= 3-5) de la actividad multiunitaria total inducida por ACh (Fig. 2).

La melatonina inhibe la actividad inducida por ACh en los nervios mesentéricos

Se probó el efecto de la melatonina sobre la actividad inducida por ACh 100 μ M y 1mM concentración menor a la EC50 y submáxima respectivamente, se pre-aplicó melatonina (0.01-1000 μ M) por 5 min y posteriormente se co-aplicó melatonina con ACh durante 3 min. La melatonina disminuyó la respuesta a acetilcolina de una manera dependiente de la concentración alcanzando una inhibición máxima de 63.08%, SEM=7.3 n=2-7 para 100 μ M de ACh y de 70.76%, SEM= 10.25 n= 3-6 para 1 mM de ACh (Fig. 3).

La melatonina no presento efecto sobre la actividad aferente del nervio mesentérico

Debido a que la melatonina fue capaz de modular negativamente la actividad aferente inducida por ACh, se evaluó el efecto de la melatonina sobre la actividad basal del nervio mesentérico. Se midió la actividad aferente basal de los nervios mesentéricos y se aplicó de manera extraluminal diversas concentraciones de melatonina (0.01-1000 μ M) por 5 min. La melatonina no tuvo efecto sobre la actividad basal del nervio (Fig. 4).

La melatonina inhibió la actividad inducida por nicotina en los nervios mesentéricos

Los receptores nicotínicos son los principales mediadores de la respuesta colinérgica en el intestino, por lo que se evaluó la capacidad de inhibición de la melatonina sobre estos receptores. Para ello se realizaron aplicaciones de nicotina 10 μ M durante 3 min y después co-aplicamos nicotina y melatonina (0.1-1000 μ M) y observamos una inhibición de la actividad multiunitaria inducida por nicotina con un promedio de 30.98% SEM= 6.6 para melatonina 300 μ M y de 73.84% SEM= 4.3 para melatonina 1 mM. n= 2 a 9 (Fig. 5).

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos durante este proyecto contribuyen al conocimiento de la participación de los receptores colinérgicos en la respuesta multiunitaria aferente del intestino delgado del ratón y muestran que la ACh aumenta la frecuencia de disparo de los nervios mesentéricos y más de la mitad de este efecto está mediado por receptores nicotínicos. La melatonina modula la respuesta nicotínica mediante el bloqueo de receptores nicotínicos dependiendo de la concentración, estos hallazgos podrían explicar al menos de manera parcial el mecanismo de acción de la melatonina en el efecto antinociceptivo entérico previamente reportado.

La curva concentración respuesta de ACh sobre la actividad multiunitaria aferente de los nervios mesentéricos muestra un comportamiento dependiente de la concentración ($EC_{50} = 298.2 \mu M$) lo cual coincide con resultados reportados anteriormente por Zhou et al. (2002) en neuronas mientéricas de cobayo con una $EC_{50} = 242 \mu M$. Estos resultados apoyan la importancia de los receptores colinérgicos en la transmisión sináptica que modula diversas funciones en el sistema nervioso entérico. Además, pudimos caracterizar el tipo de receptor involucrado en la respuesta colinérgica, haciendo uso de los antagonistas colinérgicos hexametonio y atropina, más de la mitad de la respuesta colinérgica esta mediada por receptores nicotínicos, esto puede correlacionarse con la evidencia de que la mayoría de las neuronas mientéricas reciben potenciales postsinápticos excitatorios rápidos a través de los nAChRs (Browning and Lees, 1996). Posteriormente

investigamos el efecto de la melatonina una molécula moduladora de la respuesta nicotínica que se ha mostrado tener un papel en la modulación de las respuestas nociceptivas en el sistema nervioso entérico,

La melatonina inhibió parcialmente la actividad multiunitaria inducida por ACh de manera dependiente de la concentración alcanzando un promedio de inhibición del 70% este similar a lo observado por Barajas-López et al., (1996) donde reportaron una inhibición del 80% de las corrientes nicotínicas inducidas por ACh en neuronas del plexo submucoso de cobayo (Barajas-López et al., 1996). En concordancia, el trabajo reportado por (Oliveira-Abreu et al., 2018) mostró que la melatonina reduce la excitabilidad de las neuronas del ganglio de la raíz dorsal, y refuerza el papel inhibitorio de la melatonina, pero mediante un mecanismo diferente ya que el luzindol (antagonista no selectivo de los receptores de melatonina) bloqueó el efecto inhibitorio reportado. Adicionalmente, Scott et al., (2010) reportaron una reducción en la excitabilidad neuronal en el SNC. En este estudio la melatonina redujo la excitabilidad neuronal a través de la modulación de la transmisión GABAérgica. Ya que la melatonina modula otros receptores *cys-loop* como los nicotínicos (Barajas-López et al., 1996) y los 5-HT₃ (Thor et al., 2007), sería interesante evaluar el efecto de la melatonina sobre la transmisión GABAérgica en el intestino pues existen patologías cuya etiología involucra una alteración de la excitabilidad neuronal, como el Síndrome de Intestino Irritable y Enfermedad Inflamatoria del intestino. (Seifi et al., 2014).

Por otra parte, se encontró que la melatonina no tiene efectos sobre la actividad basal de los nervios mesentéricos con las concentraciones probadas. De

manera similar la melatonina no afecta la actividad miogénica basal del intestino de pez dorado (Velarde et al., 2009); contrario a esto (Drago et al., 2002) reportó que la melatonina a dosis bajas de 1 a 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ aumenta la actividad mioeléctrica basal del intestino, pero el efecto es abolido a concentraciones altas 100 o 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$; esta discrepancia puede deberse a que los registros que llevaron a cabo, eran de actividad eléctrica muscular en un modelo *in vivo* y en nuestras condiciones aislamos el efecto sobre la actividad eléctrica aferente de los nervios mesentéricos en un modelo *in vitro*, de tal manera que es necesario probar el efecto de la melatonina sobre la contracción del intestino delgado.

El mecanismo mediante el cual la melatonina bloquea a los receptores nicotínicos no ha sido dilucidado completamente; sin embargo la serotonina (precursor de la melatonina) también inhibe a los nAChRs (Nakazawa et al., 1995)(Grassi et al., 1993) Este efecto es dependiente del voltaje por lo que se sugiere que el antagonismo se lleva a cabo mediante la unión de la serotonina a un sitio cercano a la boca del canal, o por el bloqueo de los poros abiertos (Barajas-López et al., 2001). La melatonina y la serotonina son similares estructuralmente, se especula que comparten el mismo mecanismo descrito. El efecto inhibitorio de la melatonina es sensible a la apamina lo que indica que la inhibición también podría actuar a través de los canales de K^+ activados por Ca^{2+} (Reyes-Vázquez et al., 1997).

Para continuar con la investigación del efecto modulador negativo de la respuesta nicotínica de los nervios mesentéricos del ratón es importante utilizar

inhibidores específicos de los receptores a melatonina y también evaluar el efecto de la melatonina en presencia de apamina.

CONCLUSIONES

1. La acetilcolina incrementa la actividad de los nervios mesentéricos del yeyuno de ratón de manera dependiente de la concentración.
2. La respuesta colinérgica en los nervios del yeyuno esta mediada principalmente por receptores nicotínicos
3. La melatonina inhibe parcialmente la actividad nicotínica de los nervios mesentéricos.

Lista de Figuras

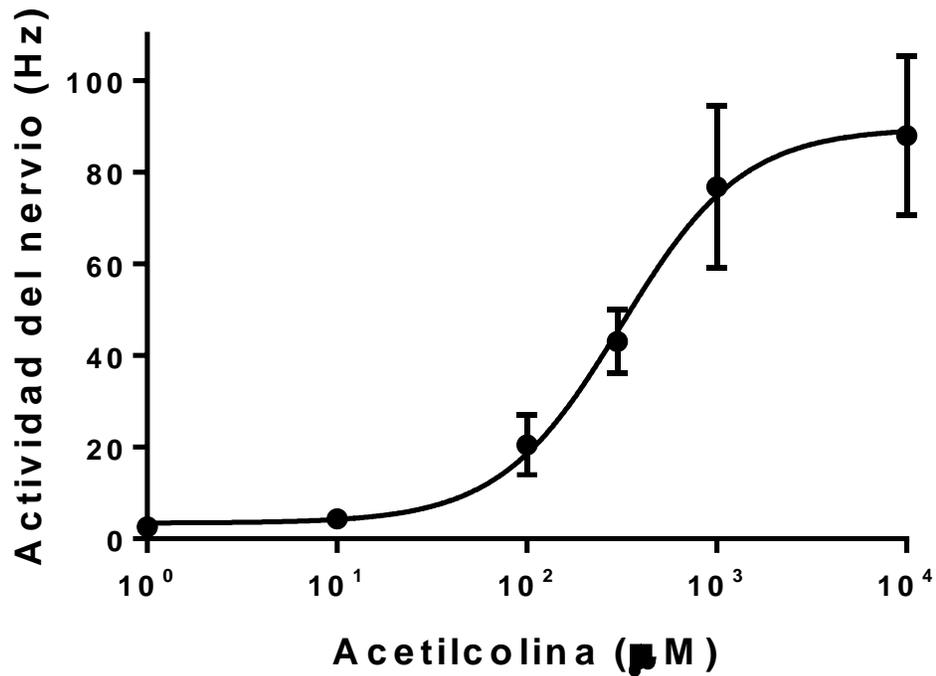


Fig. 1. La acetilcolina aumento la actividad multiunitaria aferente de los nervios mesentéricos de manera concentración dependiente.

La curva muestra la actividad multiunitaria de los nervios aferentes del yeyuno de ratón en respuesta a la aplicación extraluminal de ACh a diferentes concentraciones (10-10000 µM). Los datos representan la media y las líneas asociadas a cada circulo el S.E.M., n=3-5.

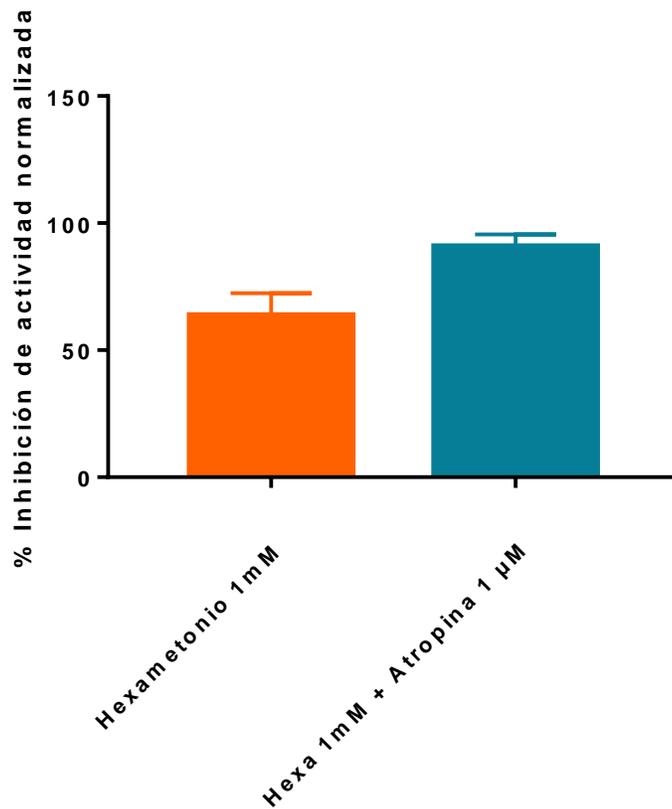


Fig. 2. La respuesta colinérgica de los nervios mesentéricos de yeyuno de ratón es mediada principalmente por receptores nicotínicos

Hexametonio 1 mM inhibe el 60% de la respuesta inducida por acetilcolina 1 mM, mientras que hexametonio 1 mM más atropina 1 μM inhibe 100% del total de la respuesta. n= 3-5.

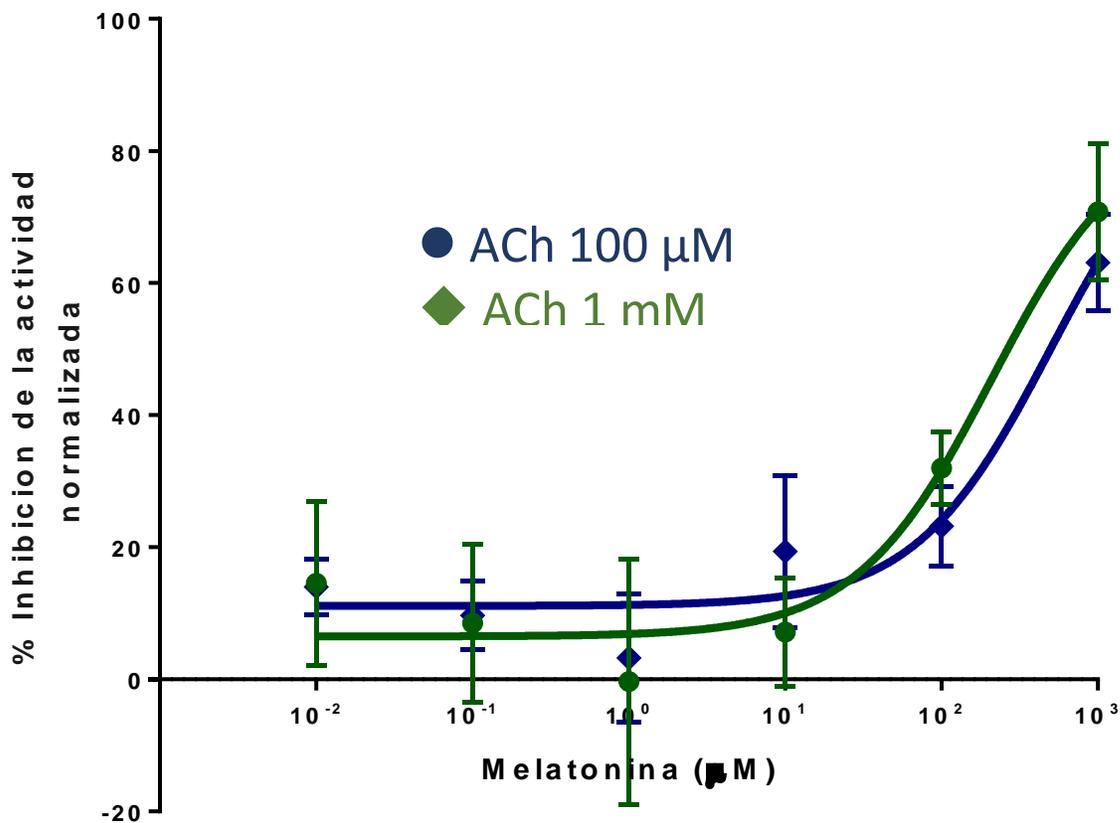


Fig. 3. La melatonina inhibe la respuesta inducida por acetilcolina de manera de pendiente de la concentración.

Efecto de inhibición de melatonina (0.01-1000 μM) sobre la respuesta producida por acetilcolina 100 μM n=3-6. Efecto de inhibición de melatonina (0.01-1000 μM) sobre la repuesta producida por acetilcolina 1 mM n=2-7. Cada circulo representa la media y las líneas asociadas a cada circulo el S.E.M

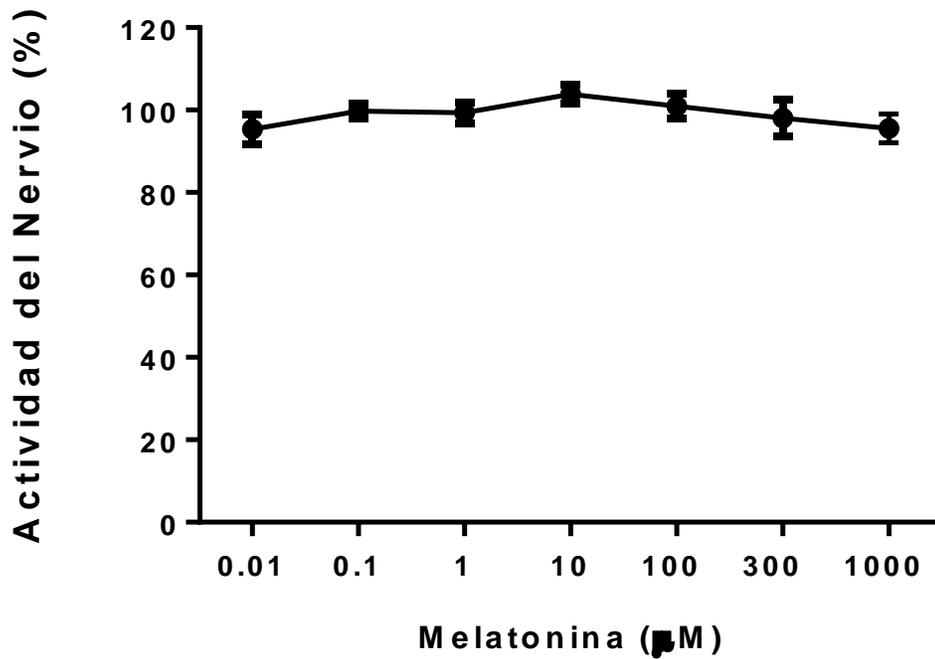


Fig. 4. La melatonina no tiene efecto sobre la actividad aferente de los nervios mesentéricos.

Efecto de la aplicación de melatonina (0.01-1000 μM) sobre la actividad basal del nervio, n= 6-13. Cada circulo representa la media y las líneas asociadas a cada circulo el S.E.M

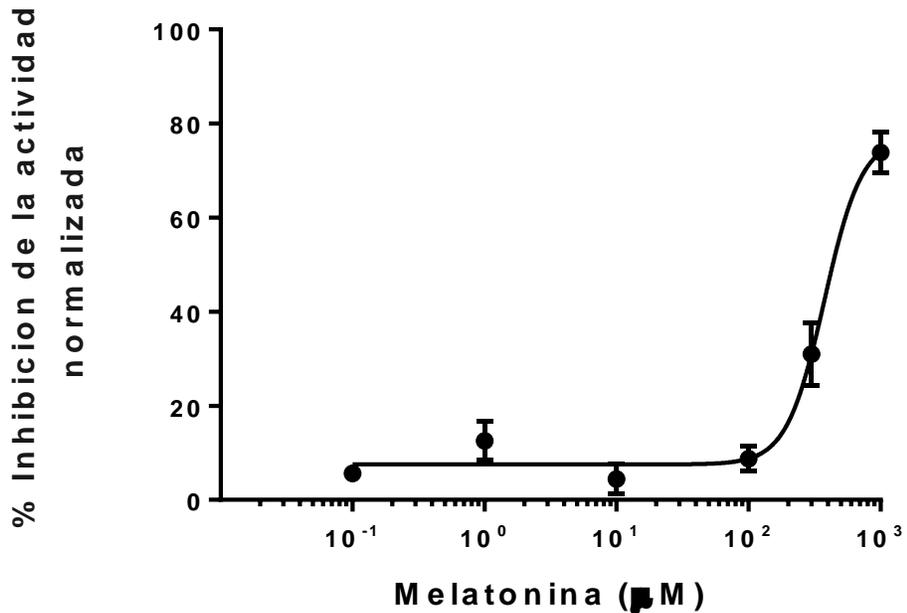


Fig. 5. La melatonina inhibe la respuesta nicotínica de manera dependiente de la concentración.

Efecto de la aplicación de melatonina (0.01-1000 µM) sobre la actividad basal del nervio inducida por 10 µM de Nicotina. SEM= 6.6 para melatonina 300 µM y de 73.84% SEM= 4.3 para melatonina 1 mM. n= 2 a 9. Cada circulo representa la media y las líneas asociadas a cada circulo el S.E.M

Bibliografía

- Albuquerque EX, Pereira EFR, Alkondon M, Rogers SW (2018) Mammalian Nicotinic Acetylcholine Receptors : From Structure to Function. :73–120.
- Bandyopadhyay D, Bandyopadhyay A, Das P, Reiter R (2002) Melatonin protects against gastric ulceration and increases the efficacy of ranitidine and omeprazole in reducing gastric damage. :1–7.
- Barajas-López C, Karanjia R, Espinosa-Luna R (2001) 5-Hydroxytryptamine and atropine inhibit nicotinic receptors in submucosal neurons. *Eur J Pharmacol* 414:113–123.
- Barajas-López C, Peres AL, Espinosa-Luna R, Reyes-Vázquez C, Prieto-Gómez B (1996) Melatonin modulates cholinergic transmission by blocking nicotinic channels in the guinea-pig submucous plexus. *Eur J Pharmacol* 312:319–325.
- Blackshaw LA, Brookes SJH, Grundy D, Schemann M (2007) Sensory transmission in the gastrointestinal tract. *Neurogastroenterol Motil* 19:1–19.
- Bornstein JC, Furness JB (1994) Electrophysiological characterization of myenteric neurons: how do classification schemes relate? *Neurogastroenterol Motil* 1838:1–15.
- Browning KN, Lees GM (1996) Myenteric neurons of the rat descending colon: Electrophysiological and correlated morphological properties. *Neuroscience* 73:1029–1047.
- Brzezinski A (1997) Melatonin in humans. *N Engl J Med* 336:336(3):186-95.
- Chan H, Lui K, Wong W, Poon A (1998) Effect of melatonin on chloride secretion by

- human colonic T84 cells. *Life Sci* 62:2151–2158.
- Chen CQ, Fichna J, Bashashati M, Li YY, Storr M (2011) Distribution, function and physiological role of melatonin in the lower gut. *World J Gastroenterol* 17:3888–3898.
- Conti A, Conconi S, Hertens E, Conti A, Conconi S, Hertens E, Skwarlo-sonta K, Markowska M, Maestroni JM (2000) Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells. :193–202.
- Costa M, Brookes SJH, Steele PA, Gibbins. I, Burcher. E, Kandiah. CJ (1996) Neurochemical classification of myenteric neurons in the guinea-pig ileum. *Neuroscience* 75:949–967.
- Drago F, Macaudo S, Salehi S (2002) Small doses of melatonin increase intestinal motility in rats. *Dig Dis Sci* 47:1969–1974.
- Flores S, Segura T (2005) Estructura y función de los receptores acetilcolina de tipo muscarínico y nicotínico. *Rev Mex Neuroci* 6:315–326.
- Furness JB, Kunze WAA, Bertrand PP, Clerc N, Bornstein JC (1998) Intrinsic primary afferent neurons of the intestine. *Prog Neurobiol* 54:1–18.
- Gahring LC, Rogers SW (2006) Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor Expression and Function on Nonneuronal Cells. 7:885–894.
- Galligan JJ, Lepard KJ, Schneider DA, Zhou X (2000) Multiple mechanisms of fast excitatory synaptic transmission in the enteric nervous system. 81:97–103.
- Grassi F, Polenzani L, Mileo AM, Caratsch CG, Eusebi F, Miledi R (1993) Blockage of nicotinic acetylcholine receptors by 5-hydroxytryptamine. *J Neurosci Res* 34:562–570.
- Kawashima K, Fujii T (2008) Forum Minireview Basic and Clinical Aspects of Non-

neuronal Acetylcholine : Overview of Non-neuronal Cholinergic Systems and Their Biological Significance. 173:167–173.

Kruse AC, Kobilka BK, Gautam D, Sexton PM, Christopoulos A, Wess J (2014) Muscarinic acetylcholine receptors : novel opportunities for drug development. Nat Publ Gr 13:549–560 Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrd4295>.

Li Y, Li S, Zhou Y, Meng X, Zhang J, Xu D (2017) Melatonin for the prevention and treatment of cancer. 8:39896–39921.

Maldonado MD, Naji L, Naranjo MC, Calvo JR (2010) Evidence of melatonin synthesis and release by mast cells . Possible modulatory role on inflammation. 62:282–287.

Nakazawa K, Akiyama T, Inoue K (1995) Block by 5-hydroxytryptamine of neuronal acetylcholine receptor channels expressed in *Xenopus* oocytes. Cell Mol Neurobiol 15:495–500.

Oliveira-Abreu K, Ferreira-da-Silva FW, Silva-Alves KS da, Silva-dos-Santos NM, Cardoso-Teixeira AC, Amaral FG do, Cipolla-Neto J, Leal-Cardoso JH (2018) Melatonin decreases neuronal excitability in a sub-population of dorsal root ganglion neurons. Brain Res 1692:1–8 Available at: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.04.027>.

Paulose K, Cassone VM (2016) The melatonin-sensitive circadian clock of the enteric bacterium *Enterobacter aerogenes*. 7:424–427.

Reyes-Vázquez C, Naranjo-Rodríguez EB, García-Segoviano JA, Trujillo-Santana J, Prieto-Gómez B (1997) Apamin blocks the direct relaxant effect of melatonin on rat ileal smooth muscle. J Pineal Res 22:1–8.

Schultz CL, Edrington TS, Callaway TR, Schroeder SB, Hallford DM, Genovese KJ

- (2006) The influence of melatonin on growth of *E. coli* O157 : H7 in pure culture and exogenous melatonin on faecal shedding of *E. coli* O157 : H7 in experimentally infected wethers *. 43:105–110.
- Scott FF, Belle MDC, Delagrangre P, Piggins HD (2010) Electrophysiological effects of melatonin on mouse per1 and non-per1 suprachiasmatic nuclei neurones in vitro. *J Neuroendocrinol* 22:1148–1156.
- Seifi M, Brown JF, Mills J, Bhandari P, Belelli D, Lambert JJ, Rudolph U, Swinny JD (2014) Molecular and Functional Diversity of GABA-A Receptors in the Enteric Nervous System of the Mouse Colon. *J Neurosci* 34:10361–10378.
- Stefulj J, Ghosh M, Schauenstein K, Rinner I, Wo A, Liebmann M (2001) Gene expression of the key enzymes of melatonin synthesis in extrapineal tissues of the rat. :243–247.
- Tack J (2000) Receptors of the enteric nervous system: potential targets for drug therapy. *Gut, nicht bekannt* 47:iv20–iv22.
- Thor PJ, Krolczyk G, Gil K, Zurowski D, Nowak L (2007) Melatonin and serotonin effects on gastrointestinal motility. *J Physiol Pharmacol* 58:97–103.
- Tien K, Siah H, Kong R, Wong M, Ho KY (2014) Melatonin for the treatment of irritable bowel syndrome. 20:2492–2498.
- Velarde E, Alonso-Gómez AL, Azpeleta C, Isorna E, Delgado MJ (2009) Melatonin attenuates the acetylcholine-induced contraction in isolated intestine of a teleost fish. *J Comp Physiol B Biochem Syst Environ Physiol* 179:951–959.
- Wess J, Eglen RM, Gautam D (2007) Muscarinic acetylcholine receptors: mutant mice provide new insights for drug development. *Nat Rev Drug Discov* 6:721
Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrd2379>.